

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07041432 A**

(43) Date of publication of application: **10 . 02 . 95**

(51) Int. Cl

A61K 47/44
A61K 9/127

(21) Application number: **06128035**

(22) Date of filing: **19 . 05 . 94**

(30) Priority: **21 . 05 . 93 JP 05141275**

(71) Applicant: **TEIJIN LTD**

(72) Inventor: **MAKINO YUJI**
SAKURAI KATSUMI
MOCHIZUKI SEIJI
SUZUKI YOSHIKI

(54) NOVEL SUSTAINED RELEASE MEDICINE COMPOSITION

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide a novel sustained release medicine composition using safe fibrinogen or fibrin enabling the continuous release of a medicine for a long period as a medicine-dispersing medium.

CONSTITUTION: The sustained release medicine composition is obtained in that a medicine-sealed liposome or lipid microsphere is homogeneously dispersed in fibrinogen or fibrin. The diameter of each liposome or lipid microsphere particle is preferably larger than approximately 200nm diameter of each mesh of the net structure of the fibrin, especially

200-1000nm, when the liposome or lipid microsphere comes into contact with a body fluid. The liposome or lipid microsphere is preferably a liposome or lipid microsphere containing a lipid, e.g. an acidic phospholipid, especially stearylamine-containing acidic phospholipid, which is negatively charged when coming into contact with the body fluid. The composition homogeneously dispersed in the fibrinogen is produced as a flowable liquid composition or solid fine particulate composition and subsequently administered into a living body. The composition homogeneously dispersed in the fibrin is produced as a semi-solid composition or semi-solid fine particulate composition and subsequently administered in a living body.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-41432

(43) 公開日 平成7年(1995)2月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 47/44	C			
9/127	A			

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平6-128035	(71) 出願人	000003001 帝人株式会社 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号
(22) 出願日	平成6年(1994)5月19日	(72) 発明者	牧野 悠治 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
(31) 優先権主張番号	特願平5-141275	(72) 発明者	桜井 克己 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
(32) 優先日	平5(1993)5月21日	(72) 発明者	望月 勢司 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 前田 純博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な徐放性医薬品組成物

(57) 【要約】

【目的】安全で、持続放出可能な徐放性医薬品組成物を提供する。

【構成】薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアが、フィブリノーゲン又はフィブリン中に均一に分散されてなる徐放性医薬品組成物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 薬物を封入したリポソーム又はリピッドマイクロスフェアがフィブリノーゲン中に均一に分散されてなる徐放性医薬品組成物。

【請求項2】 薬物を封入したリポソーム又はリピッドマイクロスフェアがフィブリン中に均一に分散されてなる徐放性医薬品組成物。

【請求項3】 該組成物が流動性の液状組成物又は固形の微粒子状組成物である請求項1記載の徐放性医薬品組成物。

【請求項4】 該組成物が半固形状組成物又は半固形の微粒子状組成物である請求項2に記載の徐放性医薬品組成物。

【請求項5】 該微粒子の直径が、 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲にある請求項3又は4に記載の徐放性医薬品組成物。

【請求項6】 該薬物が、細胞毒性を有する薬物以外の薬物である請求項1又は2に記載の徐放性医薬品組成物。

【請求項7】 該リポソーム又はリピッドマイクロスフェアが、体液と接触した時にその直径が 200 nm 以上である請求項1又は2に記載の徐放性医薬品組成物。

【請求項8】 該リポソーム又はリピッドマイクロスフェアが、体液と接触した時にマイナスに荷電する脂質を含むことを特徴とする請求項1又は2に記載の徐放性医薬品組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は新規な徐放性医薬品組成物に関する。更に詳しくは、本発明は薬物を封入したリポソーム又はリピッドマイクロスフェアが、フィブリノーゲン又はフィブリン中に均一に分散されたものである徐放性医薬品組成物に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 フィブリノーゲンは分子量約34万の線維タンパク質である。このフィブリノーゲンは、血漿タンパクの約7%を占めるトロンビン、Factor XIIIa、 Ca^{2+} 等と反応すると重合・架橋反応によりゲル状の塊（以下、フィブリンという）となる。このフィブリンは、生体適合性が良好で、生分解性であり、毒性もなく、さらに生体付着性に優れている。そのためフィブリンは生体組織接着剤として主に外科領域で組織の接着、閉鎖及び創傷治癒促進等の目的で既に使用されている。

【0003】 このような性質に加えて、（1）フィブリノーゲンは、それ単独で体内に投与しても、もともと体内にあるトロンビン、F. XIIIa、 Ca^{2+} 等により体内でフィブリンに転換しうること、あるいは（2）フィブリノーゲンとトロンビン等を体内で接触させて、その場でフィブリンに速やかに転換しうること、またさらに

（3）反応条件によってフィブリンを微粒子状の形態に成型しうること等の特徴を有することから、徐放性製剤の放出制御材料として注目されている（Senderoff, R. I. ら、J. Parent, Sci. Tech., 45 (1), 2, 1991. など）。

【0004】 実際、薬物をフィブリンにそのまま封入した製剤としてMondenらの報告（Cancer, 69 (3), 636, 1992.）及びYamamotoらの報告（Medical Postgraduates, 23 (7), 411, 1985.）によれば、制癌剤封入フィブリンを腫瘍内へ投与したところ薬物の単独投与と比較して高い治療効果が認められている。また、Sugitachi らの報告（癌と化学療法、18 (11), 1817, 1991）によれば、制癌剤封入フィブリンを担癌マウスに腹腔内投与したところ薬物の単独投与と比較して生存日数の延長が認められている。

【0005】 これら従来の薬物封入フィブリンからの薬物の放出性について、前述のSenderoff らは、デキサメタゾン含有フィブリン微粒子からの *in vitro* のトリス緩衝液（ $\text{pH} = 7.5$, 37°C ）への放出性を検討し、約5時間で含有されたデキサメタゾンの80%以上が放出されてしまうことを報告している（J. Parent, Sci. Tech., 45 (1), 2, 1991.）。

【0006】 前述のMondenら、Yamamotoら及びSugitachi らの報告では、その薬物の薬理効果についての記載はあるが、実際に薬物がどれだけの期間、どれだけの量フィブリン内に保持され、また放出され続けたかについては全く触れられていない。

【0007】 一方、宮崎らはフィブリン膜からのプレドニゾロンの放出性を検討し、3時間でほぼ100%近くが放出されることを明らかにしている（Chem. Pharm. Bull., 28 (7), 2261, 1980.）。更に宮崎らはピロカルピン含有フィブリン膜を家兎の下脛に挿入してピロカルピンの縮腫効果を調べたが、薬物単独では縮腫効果は4～5時間で消失するのに対し、フィブリン膜を適用した場合8時間持続することを報告している（Chem. Pharm. Bull., 30 (9), 3405, 1982.）。即ち、これら従来の報告の何れの場合もフィブリンからの薬物放出性は比較的速いと考えられる。

【0008】 ところで、本発明者らは、ラット皮下にフィブリンを形成せしめた後、経時的に形成場所に残存するフィブリンの重量を測定した結果、約28日後にほぼフィブリンは消失することを観測している。したがってフィブリン内に包含された薬物の可能な最大放出持続期間は、フィブリン本体の消失時間に一致し約28日と予想された。

【0009】 しかしながら現実には、分子量の異なる各種薬物をフィブリン中に包含させ、次いで *in vitro* におけるフィブリンからトリス緩衝液（ $\text{pH} 7.4$ ）中への薬物の放出性を本発明者らが検討したところ、100%放出するのに要する時間は分子量246.

10

20

30

40

50

2のFUDRで約4時間、分子量12,500のチトクローム(CYTOCHROME)cで約24時間であった。つまり通常使用される薬物の分子量の範囲ではフィブリンからの薬物の放出速度は極めて大であり、薬物は速やかに拡散して比較的短時間で放出されてしまうことが認められた。即ち、フィブリンが生体内で発揮しうる徐放性製剤としての最大放出持続期間である約28日の経過前に、フィブリンに包含されたほとんどの薬物は拡散によりフィブリンより放出されてしまいフィブリンの放出制御材料としてのポテンシャルは十分に利用されていないことが明らかとなった。

【0010】従って、フィブリンからの薬物の拡散、放出を制御し、薬物の放出性をフィブリンの生分解性と一致させることが、フィブリンの徐放性材料としてのポテンシャルを最大限発揮させることとして望まれている。

【0011】一方、特開昭61-56134号明細書には細胞毒性薬物をコラーゲン及び／又はフィブリノーゲンに分散させた流動性組成物や、その組成物を局所に投与すると内封された薬物が徐放化されることが記載されている。また細胞毒性薬物をリポソーム化してコラーゲンあるいはフィブリノーゲン中に存在させること、このリポソーム化により薬物の放出性が遅延されることが記載されている。しかしながら、リポソーム化の具体的例示はなく、リポソームの種類、その粒子径、ましてやその具体的効果については示唆されない。

【0012】更にWeiner, A.L.らは薬物含有リポソームをコラーゲンとともに投与して薬物の放出を徐放化することを示唆しているが(J.Pharm. Sci. 74 (9), 922, 1985)、薬物含有リポソームとフィブリン及び／又はフィブリノーゲンを組合せること、かかる場合のリポソームの種類、その粒子径、ましてやその効果については何ら具体的な記載も示唆もしていない。

【0013】また中井らは、ヒアルロン酸ゲルと薬物含有リビッドマイクロスフェア(脂肪小粒子)との組合せによる徐放性製剤を提案しているが(J. Controlled Release, 1992. (in press))、ヒアルロン酸ゲルが天然物ではないためその安全性については未知である。

【0014】一方、本発明者らは、フィブリンの網目構造の網目径を電顕的に解析した結果、この網目径が約200nm以下であること(後記の図2を参照のこと)、従って薬物のサイズをこの径よりも大きくすれば薬物がフィブリンから拡散しにくくなると考え、各種の方法を検討した結果、薬物をフィブリンの網目径より大きい寸法のリポソーム又はリビッドマイクロスフェアに封入することによってフィブリンからの薬物の放出を遅延させて生体内での消失をフィブリン自体の消失と一致させることが可能となることを見い出して本発明に到達した。

【0015】しかして、本発明の目的は、安全な、長期間の薬物持続放出を可能とする徐放性医薬品組成物を提

供することにある。

【0016】更に本発明の目的は、安全な、長期間の薬物持続放出を可能とする、フィブリノーゲン又はフィブリンを薬物分散媒体とする徐放性医薬品組成物を提供することにある。

【0017】

【課題を解決するための手段】即ち本発明は、薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアがフィブリノーゲン中に均一に分散されたものである徐放性医薬品組成物である。また本発明は、薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアがフィブリン中に均一に分散されたものである徐放性医薬品組成物である。

【0018】本発明で用いられるフィブリノーゲンは、分子量約34万の可溶性線維性の糖タンパクであり、血漿タンパク質の約7%を占める、哺乳動物、例えばヒト又はウシの血液からエタノール又は硫酸アンモニウム分画沈殿法など公知の方法を用いて製造されるものをいう。あるいは他の技術、例えば、組換えDNAの技術によって調製されたものでもよい。

【0019】本発明で用いられるフィブリンは、フィブリノーゲンにトロンビンが作用し、更にF. XIIIa、Ca²⁺が作用することにより生成される物理的、化学的に堅固で安定な半固形状のフィブリンが生成されるものをいい、通常フィブリノーゲン80mgに対してトロンビン30~500単位を添加して形成される。

【0020】一般にリポソーム(liposome)とは、脂質の二重層からなる内部に水層を包含する小胞体であって、天然由来脂質及び相当する合成脂質を水中に分散させた際に形成され、サイズや脂質二重層の数から分類すると多重層リポソーム(MLV、粒子径=400~3500nm)、小さな一枚膜リポソーム(SUV、粒子径=20~50nm)、大きな一枚膜リポソーム(LUV、粒子径=200~1000nm)等に分類される。

【0021】本発明のリポソームとしては、上記リポソームのうちその粒子径(直径)が200nm以上のもの、例えば多重層リポソーム、大きな一枚膜リポソームを好ましいものとして挙げることができる。直径が200nm未満の場合にはフィブリンの網目径よりも小さくなるため、薬物がフィブリンから放散・放出されがちになるからである。本発明のリポソームの粒子径としては平均直径が200nm以上のものが好ましく、なかでも200nm以上~1000nm以下が好ましい。かかるリポソームの粒子径は、本発明の徐放性医薬品組成物が生体内に投与され投与部分における体液と接することから、そのような体液と接触した時にあってフィブリンの網目構造の網目径約200nmよりも大きいこと、即ちその直径が200nm以上であることを言う。

【0022】本発明のリポソームを構成する脂質としては通常公知の脂質が使用でき、例えば、リン脂質、糖脂

10

20

30

40

50

質、コレステロール及びその誘導体等を挙げることができる。リン脂質の具体例としては、例えば、大豆レシチン、卵黄レシチン等の天然リン脂質；ジバルニトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレイルホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリン、ホスファチジルイノシトール等の合成リン脂質、水素添加レシチン等の天然リン脂質に水素添加を行なったもの等を挙げることができる。また糖脂質としては、例えば、パルミチルグルコシド、ステアシルグルコシド、ミリスチルグルコシド、コレステリルマルトシド、コレステリルグルコシド等を挙げることができる。

【0023】リポソームの表面の荷電はこれらリポソームを構成する脂質の組成により調整される。通常リポソームは上記のレシチン、ジバルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン等とコレステロールを主成分とする脂質で製造されるが、これらの脂質は体液と接触する時には電氣的に中性である。体液と接触する時にマイナスに荷電させる時にはホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ジアセチルリン酸等が通常上記の脂質に添加される。またプラスに荷電させる時にはステアリアルアミンが通常添加される。

【0024】本発明者らの知見によれば、本発明の徐放性医薬品組成物を流動性の液状組成物として投与する時はマイナスに荷電したリポソームはフィブリノーゲンと相互作用して放出の遅延をもたらすという利点がある。従って本発明のリポソームは通常のリポソームを構成する脂質の他に、マイナスに荷電させるために、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ジアセチルリン酸ホスファチジルセリン、などの酸性リン脂質を添加することが望ましい。これらのなかでもホスファチジルセリンが好ましい。これら荷電物質は通常リン脂質1モルに対して0.1～0.2モル前後添加される。

【0025】すなわち本発明のリポソームとしては体液と接触した時に電荷ないリポソーム、プラスに荷電したリポソーム、又はマイナスに荷電したリポソームを用いることができるが、なかでもマイナスに荷電したリポソーム、例えば酸性リン脂質等のような体液と接触した時にマイナスに荷電する脂質を含むリポソームを好ましいものとして挙げることができる。

【0026】かかるリポソームの製造法は通常以下の通りである。即ち、所定量の脂質を秤量し、有機溶媒（クロロホルム、エーテル等）に溶解したのち、ナス型フラスコ中ロータリーエバポレーターを用いて、減圧下で溶媒を留去、フラスコ底部に脂質の薄膜を作成する。次いで脂質を膨潤させ、更に最終的な水中分散系を得るために超音波を照射することにより形成される。

【0027】リポソームに薬物を封入するには、上記と同様の操作を行ないフラスコ底部に脂質の薄膜を作成した後、目的とする薬物水溶液と緩衝液を加え激しく振盪する。なお、薬物の脂溶性が高い場合は、該薬物はリポソームの脂質二重膜の疎水性部分に、また薬物の水溶性が高い場合は該薬物はリポソームの脂質二重膜にかこまれる内水相に分布するとされている。

【0028】リポソームの直径は以下のようにして調整することができる。均一のサイズが得られる製法、例えばフレンチプレス法、超音波処理、凍結—融解法、コール酸除去法等を用いてリポソームを調整し、更にゲル濾過（Sephacrose 4B、2B等）、限外濾過等を用いることによりサイズを均一にすることができる。

【0029】本発明で用いられるリピッドマイクロスフェア（lipid microsphere）とは、リン脂質を乳化剤に用い、水相中に大豆油を分散させた水中油型（O/W）エマルジョンで分散相の油滴は通常直径約200nmの安定な微粒子を形成している。リピッドマイクロスフェアは、油相、例えば大豆油にリン脂質等の適当な乳化剤、例えばレシチンと精製水を加えて乳化することにより得られる。通常脂溶性の薬物がリピッドマイクロスフェアの相内に封入される。薬物を封入するには上記の製造法において油相にあらかじめ薬物を溶解しておき、乳化すればよい。

【0030】リピッドマイクロスフェアの粒径は乳化方法を選択することにより調整される。通常の乳化機（ホモミキサーなど）では直径が約1μmまで、また精密乳化機（マントンゴーリン乳化機、マイクロフルイダライザーなど）では直径が約200nmまでの粒径を調整することができる。

【0031】本発明のリピッドマイクロスフェアとしては前述のリポソームと同様に体液に接触した時に電荷のないリピッドマイクロスフェア、プラスに荷電したリピッドマイクロスフェア、又はマイナスに荷電したリピッドマイクロスフェアが挙げられるが、好ましくは前述のリポソームと同じようにマイナスに荷電したリピッドマイクロスフェアを挙げることができる。かくして本発明の徐放性医薬品組成物を構成する薬物を封入したリポソーム又はリピッドマイクロスフェアを液状分散物として得ることができる。

【0032】本発明の薬物を封入したリポソーム又はリピッドマイクロスフェアがフィブリノーゲン中に均一に分散されてなる徐放性医薬品組成物は、例えば均一な流動性の液状組成物又は固形の微粒子状組成物として製造されて生体に投与されるか、あるいは、本発明の薬物を封入したリポソーム又はリピッドマイクロスフェアがフィブリン中に均一に分散されてなる徐放性医薬品組成物は、例えば半固形状組成物又は半固形の微粒子組成物として製造され生体に投与される。

【0033】まず均一な流動性の液状組成物は、例えば

前記の方法で製造した薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアの液状分散物にフィブリノーゲンを溶解することにより製造される。この場合、フィブリノーゲンは固体で該リポソーム又はリビッドマイクロスフェアの液状分散物に添加し、攪拌溶解してもよいが、あらかじめフィブリノーゲンを水等の溶媒で溶解し、得られたフィブリノーゲン溶液を該リポソーム又はリビッドマイクロスフェアの液状分散物に添加してもよい。また、薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアの液状分散物を公知の方法で凍結乾燥して固形物とし、この固形物とフィブリノーゲンとの固

体混合物に用時に水等を添加して均一で流動性の液状組成物としてもよい。
 【0034】本発明の薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアがフィブリン中に均一に分散された徐放性医薬品組成物のうち、半固形状組成物は、例えば以下の方法により製造される。先ず、上述のようなフィブリノーゲンの液状組成物は体内に投与されると、その場で体内由来のトロンビン等と反応してフィブリンへ転換し、薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアがフィブリン中に均一に分散された本発明の徐放性医薬品組成物となる。あるいは液状分散物又は固形物の薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアに、固体又は溶液状のフィブリノーゲンを加え、フィブリノーゲン含有液状組成物を調製し、これとトロンビン含有液状組成物を混合して予めフィブリンを形成させることにより本発明の薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアがフィブリン中に均一に分散されてなる徐放性医薬品組成物とすることもできる。

【0035】また、液状分散物又は固形物の薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアに、固体又は溶液状のフィブリノーゲンを加え、これとトロンビン含有液状組成物を投与時に混合し、体内でフィブリンを速かに形成させて本発明の薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアがフィブリン中に均一に分散されてなる徐放性医薬品組成物としてもよい。この場合、フィブリン生成による投与上の困難を防ぐために通常2液混合型注射針が使用され、器内で混合された2液は速かに体内に送達され、フィブリンが形成される。

【0036】一方薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアがフィブリノーゲン中に均一に分散されてなる徐放性医薬品組成物であって、固形の微粒子状組成物は、前記のフィブリノーゲンの液状組成物を公知の方法、例えばChem. Pharm. Bull., 34 (6), 263 2, 1986. に開示されているように、例えばリビッドマイクロスフェアを含有するフィブリノーゲンを界面活性剤を含む綿実油中でホモジナイズし、その後約90℃に加温することにより成型され、該微粒子状成型物を単

離洗浄後公知の分散剤により水中に均一に分散させることにより固形の微粒子状組成物とすることができる。

【0037】また本発明の薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアがフーゲン中に均一に分散されてなる徐放性医薬品組成物のうち、半固形の微粒子状組成物は、例えばJ. Parent. Sci. Tech., 45 (1), 2, 1991に開示されているように、薬物を封入したリポソームあるいはリビッドマイクロスフェアに固体又は溶液状のフィブリノーゲンを加え、これとトロンビン含有液状分散物を混合することによりフィブリン微粒子を製造し、次いでこの微粒子を公知の分散剤を用いて水中に分散させることにより半固形の微粒子状組成物を製造することができる。

【0038】本発明でリポソーム又はリビッドマイクロスフェアに封入され、フィブリノーゲン又はフィブリン中に均一に分散される薬物としては、本発明の組成物が生分解性であることから直接皮下あるいは筋肉内又は皮膚上、粘膜上に投与され、その近傍で局所的にあるいは血流に移行して全身的に作用する薬物が望ましい。

【0039】そのような例を挙げると、本発明の薬物としては、細胞毒性を有する薬物以外の薬物、例えば抗炎症薬として、アスピリン、インドメタシン、イブプロフェン、チアラミド、ケトプロフェン、ジクロフェナクナトリウム、ピロキシカム、フェンブフェン、メフェナム酸デキサメタゾン等のステロイド性抗炎症薬等が；抗生物質として、リンコマイシン、アミカシン、アモキシリン、アンピシリン、セファクロル、セファドロキシル、セファレキシン、ホスホマイシン、アムホテリシンB、リファンピシン等が；ホルモン剤として、インスリン、カルシトニン、テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン等が；サイトカインとして、G-CSF、インターロイキン、エリスロポエチン等が；オータコイドのプロスタグランジンが；骨、関節系薬剤としてシクロペンテノン、活性型ビタミンD₃及びその誘導体、例えば1, 24-(OH)₂-ビタミンD₃, 1, 25-(OH)₂-ビタミンD₃, 1, 25-(OH)₂-ビタミンD₃等が挙げられる。これらのなかでもインスリン等のホルモン剤、デキサメタゾン等のステロイド性抗炎症薬、活性型ビタミンD₃及びその誘導体を好ましいものとして挙げられる。

【0040】本発明の薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアがフィブリノーゲン又はフィブリン中に均一に分散された徐放性医薬組成物は、主に皮下あるいは筋肉内、又は皮膚、粘膜上に投与されるが、該組成物以外の通常使用される添加物と配合されて徐放性医薬品組成物となり臨床の場に供給される。このような通常使用される添加物としては、溶液のpHを一定範囲に保つ緩衝剤として、クエン酸塩、酢酸塩、リン酸塩等が；溶液の浸透圧を体液と等しくするための等張化剤として食塩、ブドウ糖等が；製剤の化学的分解、物

理的变化を抑制するための安定剤として、L-アスコルビン酸、ピロ亜硫酸ナトリウム、EDTA等が；微生物による製剤の汚染・分解を阻止するための保存剤として、安息香酸、安息香酸エステル類、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム等が挙げられる。

【0041】本発明により新規で安全な長期間の薬物放出を可能とする徐放性医薬品組成物が提供され、その臨床的価値は大きい。

【0042】

【実施例】以下、実施例、参考例により本発明を詳述するが、本発明を限定するものではない。

【0043】

【参考例1】

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \sqrt{t}$$

M_t ：任意の時間（ t ）における薬物放出積算量

M_∞ ：無限大時間における薬物放出積算量（フィブリン中の初期含量）

【0045】各種薬物の拡散定数（ K 値）と分子量との関係を図1に示した。図1から、例えば分子量246.2であるFUDRの K 値は約100（ $h^{-1/2}$ ）、チトクロームcの K 値は約30（ $h^{-1/2}$ ）であり、フィブリンからのこれらの薬物の放出性について、前者は約4時間、後者は約24時間で各々フィブリンから完全放出されることが判る。

【0046】〔実施例1，比較例1〕

(1) インスリン500 μ g（Sigma社）にTrisバッファー（pH7.4）250 μ lを加えて溶解させた。これにフィブリノーゲン（人血漿由来、Factor XIIIaを含む；化学及血清療法研究所製ボルヒール）20mgを加え37℃に加熱しながら溶解させインスリン溶解液を得た。別にトロンビン（人血漿由来、化学及血清療法研究所製ボルヒール）62.5単位に40mM CaCl₂（和光純薬）を含むTrisバッファー（pH7.4）250 μ lを加えてトロンビン溶解液を調製した。このトロンビン溶解液とインスリン溶解液を混合してインスリン含有フィブリン（500 μ l）

（半固形状組成物）を得た（A：比較例1）。

【0047】(2) 上記と同量のインスリンを含有するリポソーム（Lip）をPick, U.らの報告（Arch. Biochem. Biophys., 212, 196, 1981.）に従って調製した。リポソームを調整する際に脂質として、電荷を※

* フィブリンからの各種薬物の放出性

フィブリノーゲン（F. XIIIaを含む）20mgに適量の図1に記載の11種の薬物を溶解させたTrisバッファー（pH7.4）250 μ lを加えてフィブリノーゲンを溶解させた。この溶液にトロンビン溶液250 μ l（62.5IU）を加えて、薬物含有フィブリン（500 μ l）を得た。この得られたフィブリンを10mlのTrisバッファー（pH7.4）中に入れ、37℃で振盪させ、経時的にTrisバッファー中の薬物濃度を測定し、以下の式によって拡散定数（ K 値）を求めた。

【0044】

【数1】

※持たないLipにはホスファチジルコリン（PC）（日本油脂）を、正電荷をもつLipにはPCとステアリンアミン（SA）（和光純薬）の混合脂質（SAはPCに対してモル比で1/6）を、負電荷をもつLipにはPCとホスファチジルセリン（PS）の混合脂質を用いた。（PS/PC=1/6：モル比）。このようにして得られたLip（粒子径=200～1000nm）をTrisバッファーに懸濁した。次いで得られたインスリンを含有するLipのTrisバッファー懸濁液にフィブリノーゲンを溶解して得た流動性の液状組成物をインスリン溶解液として用いる以外は上記（1）と同様に操作してLip含有フィブリン（半固形状組成物）を調製した（実施例1，B～D）。PCからなるLip（電荷なし）を含有するフィブリンをB，（PC+SA）からなるLip（正電荷）含有フィブリンをC，（PC+PS）からなるLip（負電荷）含有フィブリンをDとした。

【0048】(3) 上記A，B，C，DをTrisバッファー（pH7.4）中に入れ37℃で振盪し、Trisバッファー中のインスリンをHPLCで経時的に定量して放出率（%）を求めた。その結果を表1に示した。

【0049】

【表1】

日数	フィブリンからのインスリンの放出率(%)			
	比較例1	実施例1 (リボソーム)		
	A	B (電荷なしLip 含有)	C (正電荷Lip 含有)	D (負電荷Lip 含有)
0	0	0	0	0
1/4	36.1	1.6	2.3	1.1
1	75.6	3.5	3.6	1.3
4	79.2	6.9	7.2	2.9
7	80.3	9.8	10.1	5.0

【0050】 [実施例2, 比較例2]

(1) デキサメタゾン (Sigma社) 25 μ gを250 μ lのTrisバッファー (pH7.4) に懸濁させ、更にホスフェチジルコリン (PC) 300mgを加えてポリトロン (KINEMATICA製) で乳化した。この溶液を用いて実施例1と同様に操作してフィブリンを調製した (A; 比較例2)。

【0051】 (2) デキサメタゾン31.25 μ gに精製大豆油250mgを加えて溶解させ、PC30mgを加え、加温 (80℃) しながらホモジナイズ (ポリトロン、10⁴ rpm×60min) し、Trisバッファーを加えて全量を1.25mlとした。この溶液をマイクロフルイダイザーを用いて精乳化し、その後濾過して直径約1 μ mのリピッドマイクロスフェア (LM) のTrisバッファー懸濁液を得た。

*

* 【0052】 実施例1と同様に (PC+SA) を用いたLM、(PC+PS) を用いたLMも各々同様に操作して得た。各LMを250 μ l分取り、実施例1と同様に操作してLM含有フィブリン (半固形状組成物) を得た (実施例2, B~D)。PCを用いた各LM含有フィブリンをB、(PC+SA) を用いたものをC、(PC+PS) を用いたものをDとした。

【0053】 (3) A, B, C, 及びDのフィブリンからのデキサメタゾンの放出率 (%) を0.02% PC/Trisバッファー (pH7.4) (37℃) 中のデキサメタゾン量をHPLCで経時的に測定することにより求めた。その結果を表2に示した。

【0054】

【表2】

日数	フィブリンからのデキサメタゾンの放出率(%)			
	比較例2	実施例2 (リピッドマイクロスフェア)		
	A	B (電荷なしLM含有)	C (正電荷LM含有)	D (負電荷LM含有)
0	0	0	0	0
1/4	96.2	1.8	2.0	1.2
1	98.8	3.8	3.4	1.1
4	99.2	7.3	6.9	3.2
7	99.8	10.2	10.5	5.0

【0055】 [実施例3, 比較例3]

(1) 実施例1と同様に操作してインスリン溶解液、トロンビン溶解液を得た。実施例1と同量のフィブリン及びトロンビン溶解液を2液混合注射器を用いてマウス皮下に注入し、マウス皮下においてフィブリンを形成させた (A; 比較例3)。

【0056】 (2) 実施例1と同様にPC、(PC+SA)、(PS+PC) を用いて調製したLip含有フィブリンノーゲン溶解液 (流動の液状組成物) を、これと同量のトロンビン溶液と2液混合注射器を用いてマウス皮下に注射した (実施例3, B~D)。このようにして形

成させたフィブリンを各々PCを用いたものをB、(PC+SA) を用いたものをC、(PC+PS) を用いたものをDとした。

【0057】 (3) 上記4つのフィブリン (半固形状組成物) について、フィブリンをマウス皮下から摘出することによりフィブリンの残存率 (%) を経時的に測定した。またフィブリン中のインスリン残存率 (%) は実施例1と同様にして経時的に測定した。各々の結果を表3に示した。

【0058】

【表3】

日数	フィブリンの残存率(%)とインスリン残存率(%)							
	比較例3		実施例3 (リボソーム)					
	A		B (電荷なしLip 含有)		C (正電荷Lip 含有)		D (負電荷Lip 含有)	
	フィブリン 残存率	インスリン 残存率	フィブリン 残存率	インスリン 残存率	フィブリン 残存率	インスリン 残存率	フィブリン 残存率	インスリン 残存率
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	95.1	18.1	94.9	90.1	95.1	89.2	95.4	95.0
4	70.2	12.6	71.2	63.2	71.1	60.1	70.1	70.0
7	59.9	8.2	57.9	34.9	58.7	35.6	60.1	46.1
14	45.8	1.4	46.1	15.1	45.0	14.8	43.8	26.1
21	20.2	0	22.8	5.4	24.0	6.0	23.5	16.2
25	2.8	0	3.5	0.6	1.9	0.5	2.2	1.3

【0059】 [実施例4, 比較例4] 実施例2と同様に
して得た4種類 (A (比較例4); B, C, D (実施例
4, B~D)) のフィブリン (半固形状組成物) をマウ
ス皮膚を切開して皮下に挿入した。経時的に摘出し、フ
ィブリンの残存率 (%) を測定した。フィブリン中のデ*

*キサメタゾン残存率 (%) は実施例2と同様に操作して
測定した。各々の結果を表4に示した。

【0060】

【表4】

日数	フィブリンの残存率(%)とデキサメタゾン残存率(%)							
	比較例4		実施例4 (リビットマイクロスフェア)					
	A		B (電荷なしLM含有)		C (正電荷LM含有)		D (負電荷LM含有)	
	フィブリン 残存率	デキサメタ ゾン 残存率	フィブリン 残存率	デキサメタ ゾン 残存率	フィブリン 残存率	デキサメタ ゾン 残存率	フィブリン 残存率	デキサメタ ゾン 残存率
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	95.0	2.1	95.5	88.1	94.9	88.4	95.3	95.0
4	69.9	1.0	70.9	58.4	68.9	59.0	70.0	69.8
7	60.0	0.5	60.0	35.4	61.1	36.8	59.7	46.3
14	46.4	0.2	46.1	15.1	48.6	16.4	46.0	25.9
21	19.8	0	21.8	3.2	19.0	2.2	20.2	11.2
25	2.0	0	2.4	0.5	1.5	0.4	1.6	1.0

【0061】 [実施例5, 比較例5] 実施例1と同様に
して得た4種類 (A (比較例5); B, C, D (実施例
5, B~D)) のフィブリノーゲン溶液 (流動性の液状
組成物) を各々マウス皮下に注入してフィブリン (半固
形状組成物) を形成させた。注入部位の皮膚を剥離し、
付着しているフィブリンを取り出した。取り出したフィ※

※ブリンの残存率 (%) を経時的に測定した。フィブリン
中のインスリン残存率 (%) は実施例1と同様に操作し
て経時的に測定した。各々の結果を表5に示した。

【0062】

【表5】

日数	フィブリンの残存率(%)とインスリン残存率(%)							
	比較例5		実施例5 (リボソーム)					
	A		B (電荷なしLip 含有)		C (正電荷Lip 含有)		D (負電荷Lip 含有)	
	フィブリン 残存率	インスリン 残存率	フィブリン 残存率	インスリン 残存率	フィブリン 残存率	インスリン 残存率	フィブリン 残存率	インスリン 残存率
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	90.1	18.0	89.5	81.8	89.1	82.0	89.0	88.0
7	58.7	8.1	57.6	46.1	57.1	46.3	58.0	56.8
14	45.1	1.5	44.1	15.6	45.1	16.0	45.2	26.1
21	18.1	0	17.2	2.0	17.9	2.4	17.6	12.1
25	1.6	0	1.5	0.3	1.6	0.4	1.5	1.2

【0063】 [実施例6, 比較例6] 実施例2と同様に操作して得た4種類 (A, B, C, D) のフィブリンノーゲン溶液 (流動性の液状組成物) を各々マウス皮下に注入してフィブリン (半固形組成物) を形成させた。皮下からのフィブリン抽出は実施例5と同様に実施し、フィ*

* プリンの残存率 (%) 及びフィブリン中のデキサメタゾン残存率 (%) は実施例2と同様に操作して経時的に求めた。各々の結果を表6に示した。

【0064】

【表6】

日数	フィブリンの残存率(%)とデキサメタゾン残存率(%)							
	比較例6		実施例6 (リビッドマイクロスフェア)					
	A		B (電荷なしLM含有)		C (正電荷LM含有)		D (負電荷LM含有)	
	フィブリン 残存率	デキサメタゾン 残存率	フィブリン 残存率	デキサメタゾン 残存率	フィブリン 残存率	デキサメタゾン 残存率	フィブリン 残存率	デキサメタゾン 残存率
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	90.1	18.0	89.5	82.0	89.1	81.7	89.0	88.1
7	58.7	8.1	57.6	47.1	57.1	46.8	58.0	57.0
14	45.1	1.5	44.1	15.9	45.1	16.4	45.1	27.1
21	18.1	0	17.2	2.8	17.9	3.1	17.2	11.2
25	1.6	0	1.5	0.5	1.6	0.6	1.5	1.1

【0065】 [実施例7] 実施例1と同様に操作し、インスリンを含有するPC、(PC+SA)、PSからなるLipを得た。Lip含有フィブリン微粒子 (半固形の微粒子状組成物) は、微粒子を酢酸エチル/0.05% PCで洗浄し次いで凍結乾燥する以外は、Sendernoffらの報告 (J. Parent. Sci. Tech., 45 (1), 2, 1991) に従って得た。PC、(PC+SA)、(PC+PS) からなるLipを含むフィブリン微粒子を各々A, B, Cとし、Lipの代りにこれと同量のインスリンを含む溶液を用いて上記と同様に操作して得たフィブリン微粒※

※子をDとした。A, B, C, Dを500 μ l生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁し、マウス皮下に投与した。Ogawaらの報告 (J. Chem. Pharm. Bull., 36 (7), 2576, 1988) に従って経時的に投与部位のフィブリン微粒子を取り出し、その残存量をHPLCで定量することにより、フィブリン微粒子中のインスリン残存率 (%) を求めた。その結果を表7に示した。

【0066】

【表7】

日数	インスリン残存率 (%)			
	本発明 (リボソーム)			比較例
	A (電荷なしLip含有)	B (正電荷Lip含有)	C (負電荷Lip含有)	D
0	100	100	100	100
1	80.9	80.1	88.1	81.2
4	63.2	60.3	72.3	16.3
7	47.4	46.2	57.1	1.1
14	11.0	10.4	20.6	0
21	2.1	1.6	10.1	0

【0067】 [実施例8] 実施例2と同様に操作してデキサメタゾンを含むPC、(PC+SA)、(PC+PS)を乳化剤としたLM (直径約1 μ m) のTribuffer懸濁液を得た。LM含有フィブリン微粒子 (半固形の微粒子状組成物) はデキサメタゾンとLMを用いること以外は実施例7と同様に操作して得た。PC、(PC+SA)、(PC+PS)を乳化剤とするLM含有フィブリン微粒子を各々A、B、Cとした。LM*

*の代りにこれと同量のデキサメタゾンを含む溶液を用いて調製したフィブリン微粒子をDとした。経時的なフィブリン微粒子中のデキサメタゾン残存量は実施例7と同様に操作して定量し、その残存率 (%) を求めた。その結果を表8に示した。

【0068】

【表8】

日数	デキサメタゾン残存率 (%)			
	本発明 (リピッドマイクロスフェア)			比較例
	A (電荷なしLM含有)	B (正電荷LM含有)	C (負電荷LM含有)	D
0	100	100	100	100
1	80.4	81.1	88.5	80.0
4	64.1	61.1	72.6	15.5
7	46.1	45.4	56.9	1.0
14	11.4	10.3	21.1	0
21	1.5	1.8	10.5	0

【0069】 [実施例9] 実施例1と同様に操作してPCからなるLip (粒子の直径=200~1000nm) 含有フィブリンを得た (A)。PCを脂質に用いてSunamotoらの報告 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 94, 1367, 1980.) に従ってLip (粒子の直径=20~35nm) を得た。このLipを含有したフィブリン※40

※ (半固形状組成物) は実施例1と同様に操作して得た (B)。各々のフィブリンからのインスリン放出率 (%) は実施例1と同様にして求めた。その結果を表9に示した。

【0070】

【表9】

日数	インスリン放出率 (%)	
	A (電荷なしLip含有)	B (電荷なしLip含有)
0	0	0
1/4	1.2	32.1
1	1.3	72.4
4	3.1	76.1
7	5.4	77.2

注) AのLipの直径200~1000nm

BのLipの直径 20~ 35nm

【0071】 [参考例2] 実施例1と同様に操作し、P CからなるLip (粒子の直径=200~1000nm) 含有フィブリン (A) 及びインスリン含有フィブリン (B) (半固形状組成物) を得た。実施例1と同量のインスリンを含むLip (粒子径=200~1000nm) 含有コラーゲンゲル (C) 及びインスリン含有コラーゲンゲル (D) はWeiner A.L. らの報告 (J. Pharm. Sci., 74 (9), 922, 1985) に従って得た。インスリン*

* 含有コラーゲンゲルは、Lipの代りにこれと同量のインスリンを含む溶液 (Trisバッファー (pH7.4) に溶解) を用いて調製した。上記A, B, C, Dからのインスリン放出率 (%) を実施例1と同様に操作して求めた。その結果を表10に示した。

【0072】

【表10】

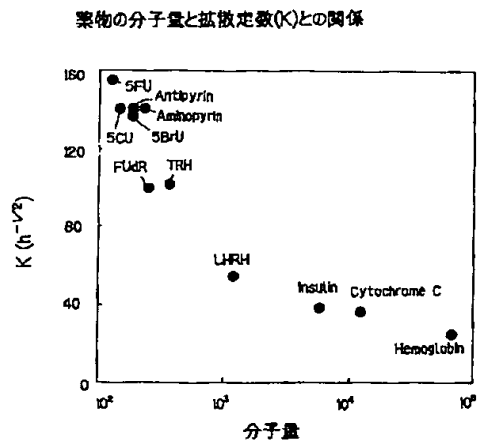
日数	インスリン放出率 (%)			
	フィブリン		コラーゲンゲル	
	本発明	比較例	比較例	比較例
	A (電荷なしLip含有)	B	C (電荷なしLip含有)	D
0	0	0	0	0
1/4	1.2	36.1	18.2	38.2
1	1.3	75.6	27.1	76.1
4	3.1	79.2	49.1	80.1
7	5.4	80.3	74.2	80.6

【図面の簡単な説明】

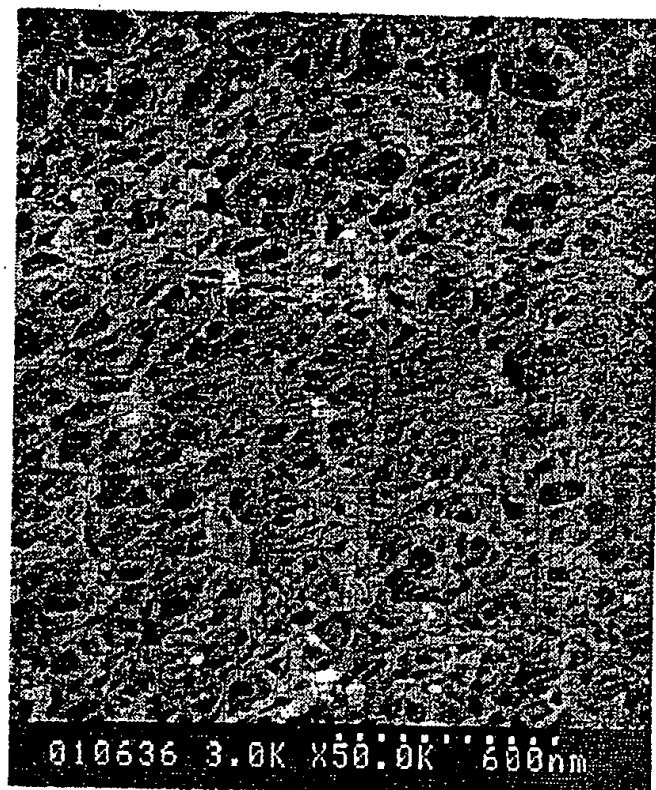
【図1】 図1は参考実験1における薬物の分子量と拡散定数 (K) との関係を示す。

※ 【図2】 図2はフィブリンの網目構造の電子顕微鏡写真を示す。図2からフィブリンの網目構造の網目径は約200nm以下であることが推定される。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 嘉樹

東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人
株式会社東京研究センター内